

⑫ 公開特許公報(A) 平3-38587

⑬ Int. Cl.<sup>9</sup>

C 07 D 487/22  
B 01 J 31/22

識別記号

Z

庁内整理番号

8314-4C  
6939-4G

⑭ 公開 平成3年(1991)2月19日

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全13頁)

⑮ 発明の名称 酸化反応を触媒する標識化合物

⑯ 特 願 平1-171372

⑰ 出 願 平1(1989)7月3日

⑱ 発 明 者 上 野 景 平 熊本県熊本市水前寺公園25-39  
⑱ 発 明 者 相 良 文 雄 熊本県熊本市池田3丁目1343-7  
⑱ 発 明 者 志 賀 匡 宜 熊本県熊本市小山町1226-39  
⑲ 出 願 人 株式会社同仁化学研究 熊本県熊本市健軍町2861番地  
所

# Best Available Copy

## 明 細 書

### 1. 発明の名称

酸化反応を触媒する標識化合物

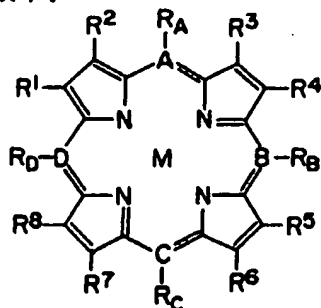
### 2. 特許請求の範囲

一般式、 $Z-[X-L-Y]_n$  ( $n$ は0から

4までの整数)で表される金属錯体化合物。

ここでZは下記ポルフィリン骨格を有する金属

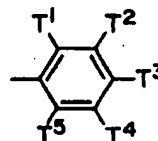
錯体を表す。



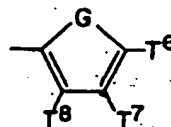
上記構造中、A~Dは、それぞれ独立に $sp^2$ 炭素または窒素を表す。置換基 $R^1 \sim R^8$ は、それぞれ $-(CH)_k-E$ 、または、 $-(CH=CH)_k-E$  ( $k$ は0または1、 $R$ はHまたはOH、 $E$ はH、CHO、 $CO_2H$ 、 $SO_3H$ のいずれか

を表し、また $R$ 、 $E$ はそれぞれ一般式中の $X$ と結合してもかまわない。)のいずれかである。また、 $R^1 \sim R^2$ 、 $R^3 \sim R^4$ 、 $R^5 \sim R^6$ 、 $R^7 \sim R^8$ はそれぞれピロール環に結合したベンゼン環でもかまわない。

つぎに、メソ位置換基 $R_A \sim R_D$ はつぎの3つのうちから選ばれる。

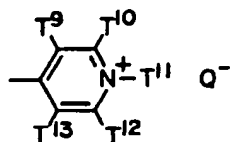


( $T^1 \sim T^5$ はそれぞれ、H、ハロゲンまたはアルキル基であり、そのうち1つは一般式中の $X$ と結合してもかまわない。)



( $G$ はOまたはSを表す。 $T^6 \sim T^8$ はそれぞれH、ハロゲン、またはアルキル基でありそのうち

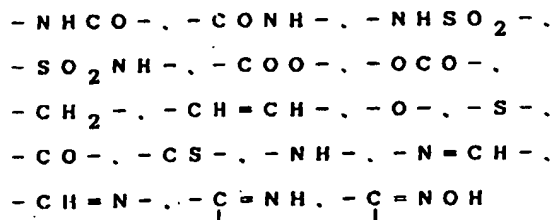
1つは一般式中のXと結合してもかまわない。)



( $T^9 \sim T^{13}$ はそれぞれH、ハロゲンまたはアルキル基でありそのうち1つは一般式中のXと結合してもかまわない。またQはハライドアニオン、 $CH_3SO_4^-$ 、 $OSO_2CF_3^-$ 、 $OSO_2P^-$ または $OSO_2$ -- $CH_3$ のいずれかを選択している。)

つぎに金属MはFe、Cr、Mn、Co、Ni、Cu、Zn、Mo、Cd、Osのいずれかである。

Xはポルフィリン骨格とスプーサーLとの結合部分でありつぎのなかから選ばれる。



題があり、放射性同位元素を用いないラベル化法の開発が積極的に検討されている。すでに蛍光色素を導入したものやペルオキシダーゼ等の酵素を導入し、酸化発色試薬あるいは化学発光で検出するシステムなどが考案されている。しかしながら、これらのシステムは従来の放射性同位元素を用いるものに比べて簡便さに欠ける、あるいは酵素をラベルした場合標識体の性質が変化するなどの点において改良の余地がある。

すでに非放射性同位元素標識用のDNAプローブ作成キットが数社から出されている。これはピオチンを用いた固相標識で行い、ペルオキシダーゼあるいはアルカリホスファターゼ標識したアビジンと結合させNTB等の色素で検出するもの、あるいは直接ペルオキシダーゼで標識しDNAプローブとルミノール-過酸化水素で生じる化学発光を検出するものなどである。得られる検出限界は、DNA量として0.1~0.2 pgと高く放射性同位元素標識のものと比較して同等あるいはそれ以上の感度を有している。ペルオキシダー

ゼは官能基Yを結合スプーサー部分であり- $(CH)_m$ 、- $(CH_2CH_2O)_m$ または- $(OCH_2CH_2)_m$ のいずれかである。(ここでRはHまたはOH、mは0から10までの整数である。)

Yはタンパク質または核酸と共有結合する官能基または共有結合する官能基に変換しうる基である。

### 3 発明の詳細な説明

本発明は、核酸やタンパク質の化学発光による微量検出のための新規ポルフィリン金属錯体化合物に関するものである。分子生物学における核酸やタンパク質などを取り扱う各種実験において、現在、 $^{32}P$ や $^{35}S$ などの放射性同位元素はこうした生体成分のラベル化に欠かせないものとなっている。これらの放射性同位元素はラベルした化合物の性質がほとんど変化しないことと、長時間積算することにより極めて微量の化合物が検出できることにおいて優れているが、人体や環境に及ぼす危険性や得られたラベル体の不安定さに因

ぜの場合にはエンハンサーを用いて感度を向上させている。

現在、化学発光をDNAプローブに応用しているシステムとしては、ペルオキシダーゼをDNAに標識してルミノール-過酸化水素で発光させX線フィルムに生じた発光を写しとるものがある(アマシャム社)。これはペルオキシダーゼをポリアミンに固定したものをさらにDNAに付加することにより標識する方法をとっている。この方法は、標識体の分子量が数万以上と大きく、比較的短いDNAフラグメントをプローブとする場合にはこのことは非常に不利である。また、酵素を用いている点で標識体が不安定であり長期間の保存に耐えない点も問題となる。

以上のことから、すでに実用化されているシステムに代わる新規なDNAプローブの開発を行う必要がある。高感度分析が可能と思われる化学発光を利用したDNAプローブの研究を行い今回、簡便にラベル化でき、分子量が小さく、しかも安定な標識体が得られる新規ポルフィリン金属錯体

化合物を開発するに至った。これら化合物を用い、得られたDNAプローブをドットハイブリダイゼーション及び、サザンハイブリダイゼーションに使用し、生じた化学発光を写真フィルムで検出し良好な結果を得た。この化学発光はフォトンカウンター等を用いて計測しても同様な結果が得られる。また、これら化合物はタンパク質検出にも利用できる。これら化合物を標識に用いるシステムは酵素をまったく使用しない点にあり、したがって、標識体は長期間安定でありキット化する場合にも有利であると思われる。また、金属触媒で標識するための酵素と比較してその分子量が小さいことから核酸やタンパク質の性質に及ぼす影響が小さいといった特徴がある。

本発明化合物で標識した化合物は過酸化水素、過ほう酸イオン、または酸素が物質を酸化する反応を触媒する。従って、この本発明化合物で標識した化合物は、過酸化水素、過ほう酸イオンあるいは酸素の存在下で化学発光試薬、酸化発色試薬等を共存させることにより生じる、化学発光ある

いは色素等として用いることができる。本発明化合物が触媒する代表的な化学発光試薬としては、ルミノール誘導体が挙げられ、酸化発色試薬としてはアニリン系誘導体が挙げられる。また被標識化合物としては生体関連物質である核酸、タンパク質またはオリゴペプチドなどが挙げられる。本発明化合物は一般に水系の溶液を用いて被標識化合物と反応させる。官能基の種類によりDCC(ジシクロヘキシルカルボジイミド)、WSC(水溶性カルボジイミド:ジメチルアミノプロピルエチルカルボジイミド塩酸塩)等の縮合剤を用いる場合もある。本発明に使用されるポルフィリン系金属錯体は上記化合物に限定されるものではなく2種類以上を使用することもできる。本発明化合物は側鎖官能基を有し、これにより目的とする被標識化合物と直接またはスペーサーを介して結合する。スペーサーとしては末端ジアミノアルキル、アミノカルボン酸、ジホルミル化合物、ジカルボン酸、ジカルボン酸クロリド、ジハロゲン化アルキル、キノンフェニレンジアミン、ジスルホン酸クロリド

ド、ジイソシアナト化合物等の二官能性試薬を用いる。以下、一置換ポルフィリン誘導体、四置換ポルフィリン誘導体、一置換フタロシアニン誘導体、四置換フタロシアニン誘導体に分類し、それぞれ実施例を挙げ詳細に説明する。

#### 一置換ポルフィリン誘導体の一般的合成法

置換基R(Rは一般構造式中のXの形成に必要な任意の官能基)を有するベンズアルデヒド、チオフェンカルボキシアルデヒド、あるいはフラアルデヒドと、Rを有しないベンズアルデヒド、チオフェンカルボキシアルデヒド、あるいはフラアルデヒドとをモル比で1:3になるように有機酸性溶液中で混合し、これを加熱しながらピロールを滴下する。ピロールはRを有するアルデヒド化合物の4倍モル量を用いる。また、ビリジアルデヒドを用いる場合はビリジアルデヒドとピロールを等モル混合し同様の反応操作を行う。有機酸性溶液としてはプロピオン酸が一般に適当である。滴下後、数時間加熱し、放冷後濃縮して得られた固体を有機酸、メタノール、熱水等で洗浄、

あるいはクロロホルム等に溶解し不溶物を除いたのち、一般にシリカゲルカラムクロマトグラフにより精製する。得られたポルフィリン誘導体を等モルの任意の金属塩あるいは金属アセチルアセトナト錯体の金属化合物と共に有機溶媒中で反応させる。有機溶媒としては酢酸、ベンゼン、ビリジン等が一般に適当である。反応後生成した沈殿を濾取し酢酸、ベンゼン、ビリジン等の有機溶媒で洗浄、あるいは再結晶し置換ポルフィリン錯体を合成する。

分子内置換基Rはそのまま、もしくは任意の官能基に変換した後、一般構造式中のYとして用いるか、あるいは、そのまま、もしくは任意の官能基に変換後、一般構造式中のX-1の形成に必要な試薬とともに溶媒中で反応しクロマトグラフにより精製する。ただし、テトラビリジルポルフィリン錯体の場合は等モルの試薬と反応させ、シリカゲルカラムクロマトグラフで精製することにより、4つのビリジン環の1つに置換基Rを導入し、一置換ポルフィリン誘導体を合成する。その場合

の置換基Rも同様にその、あるいは任意の官能基に変換して一般構造中のYあるいはX-Lの形成に用いる。側鎖を導入した場合、その末端官能基は、そのまま、もしくは任意の官能基に変換して一般構造中のYとする。

一般構造式中のX-L-Yについては、そのうちの数種について実施例の項で詳細を記す。

以下に合成した新規ボルフィリン錯体化合物の一部を示す。

$\alpha$ -(4-アミノエチルカルバモイルフェニル)- $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -トリフェニルボルフィナトFe (Ⅱ) 青紫色結晶

$\alpha$ -(4-アミノエチルカルバモイルフェニル)- $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -トリフェニルボルフィナトCu (Ⅱ) 紫色結晶

$\alpha$ -(4-アミノエチルカルバモイルフェニル)- $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -トリフェニルボルフィナトCo (Ⅱ) 紫色結晶

$\alpha$ -(4-アミノエチルカルバモイルフェニル)- $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -トリフェニルボルフィナトZn

モイルフェニル)- $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -トリフェニルボルフィナトCr (Ⅱ) 青紫色結晶

$\alpha$ -(4-ホルミルプロピルアミドエチルカルバモイルフェニル)- $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -トリフェニルボルフィナトOs (Ⅱ) 黒青色結晶

$\alpha$ -(4-カルボキシフェニル)- $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -トリフェニルボルフィナトFe (Ⅱ) 紫色結晶

$\alpha$ -(4-カルボキシフェニル)- $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -トリフェニルボルフィナトCr (Ⅱ) 黒青色結晶

$\alpha$ -(4-カルボキシフェニル)- $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -トリフェニルボルフィナトCo (Ⅱ) 青紫色結晶

$\alpha$ -(4-カルボキシフェニル)- $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -トリフェニルボルフィナトZn (Ⅱ) 紫色結晶

$\alpha$ -(4-アミノフェニル)- $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -トリフェニルボルフィナトFe (Ⅱ) 紫色結晶

$\alpha$ -(4-アミノフェニル)- $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -トリフェニルボルフィナトMn (Ⅱ) 紫色結晶

$\alpha$ -(4-アミノフェニル)- $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -トリフェニルボルフィナトZn (Ⅱ) 青紫色結晶

$\alpha$ -(4-アミノフェニル)- $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -トリ

(Ⅱ) 青紫色結

$\alpha$ -(4-イソシアナトプロピルカルバモイルフェニル)- $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -トリフェニルボルフィナトFe (Ⅱ) 黒紫色結晶

$\alpha$ -(4-イソシアナトプロピルカルバモイルフェニル)- $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -トリフェニルボルフィナトCr (Ⅱ) 青紫色結晶

$\alpha$ -(4-イソシアナトプロピルカルバモイルフェニル)- $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -トリフェニルボルフィナトMn (Ⅱ) 紫色結晶

$\alpha$ -(4-ホルミルプロピルアミノフェニル)- $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -トリフェニルボルフィナトFe (Ⅱ) 青紫色結晶

$\alpha$ -(4-ホルミルプロピルアミノフェニル)- $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -トリフェニルボルフィナトNi (Ⅱ) 青紫色結晶

$\alpha$ -(4-ホルミルプロピルアミドエチルカルバモイルフェニル)- $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -トリフェニルボルフィナトFe (Ⅱ) 青紫色結晶

$\alpha$ -(4-ホルミルプロピルアミドエチルカルバ

フェニルボルフィナトCo (Ⅱ) 青紫色結晶

$\alpha$ -(4-(4-ニトロフェニルオキシカルボニル)フェニル)- $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -トリフェニルボルフィナトFe (Ⅱ) 黒青色結晶

$\alpha$ -(4-(4-ニトロフェニルオキシカルボニル)フェニル)- $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -トリフェニルボルフィナトMo (Ⅴ) 青紫色結晶

$\alpha$ -(4-クロロカルボニルフェニル)- $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -トリフェニルボルフィナトFe (Ⅱ) 青紫色結晶

$\alpha$ -(4-クロロカルボニルフェニル)- $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -トリフェニルボルフィナトZn (Ⅱ) 紫色結晶

$\alpha$ -(4-スクシンイミジルオキシカルボニルフェニル)- $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -トリフェニルボルフィナトFe (Ⅱ) 青紫色結晶

$\alpha$ -(4-スクシンイミジルオキシカルボニルフェニル)- $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -トリフェニルボルフィナトMn (Ⅱ) 紫色結晶

$\alpha$ -(4-(N-スクシンイミドキシホルミルエ

チル)ピリジル)- $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -トリス(4-ピリジル)ボルフィナトFe(III) 暗紫色結晶

$\alpha$ -(4-(N-サクシンイミドキシホルミルエチル)ピリジル)- $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -トリス(4-ピリジル)ボルフィナトCd(II) 紫色結晶

$\alpha$ -(3-アミノ(2-チエニル))- $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -トリス(2-チエニル)ボルフィナトFe(III) 黒青色結晶

$\alpha$ -(3-アミノ(2-チエニル))- $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -トリス(2-チエニル)ボルフィナトMo(V) 暗紫色結晶

$\alpha$ -(3-アミノ(2-チエニル))- $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -トリス(2-チエニル)ボルフィナトOs(III) 黒青色結晶

以下に、実施例を挙げてより詳細に説明する。

#### 実施例 1

1-1.  $\alpha$ -(4-アミノエチルカルバモイルフェニル)- $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -トリフェニルボルフィナトFe(III) 上の合成

無水酢酸 11.3 g とプロピオン酸 200 ml

れた固体を乾燥し、化合物 1 を得た。

1-2. 化合物 1 で標識した DNA の化学発光法による検出 (1)

λファージ DNA (Hind III で切断) (以下、λファージ DNA とする) 10 μg / 20 μl 水溶液、 $2.5 \times 10^{-4}$  M の化合物 1 を 8 μl、及び 0.05% のグルタルアルデヒド 3 μl を混合し、溶液量を 50 μl とし 42℃ で 10 分間反応させ、DNA を標識した。反応後、エタノール 100 μl および 3 M 酢酸ナトリウム (pH 5) 水溶液 5 μl を加え、ドライアイス中で 1 時間冷却し生じた標識 DNA の沈殿を遠心分離により回収した。得られたペレットを水 50 μl に溶解し、遠心分離して上清をとり DNA アプローブ溶液とした。

ニトロセルロースフィルター上に、λファージ DNA 量が 10 pg、100 pg、1 ng、10 ng、100 ng となるようにスポットし減圧下 80℃ で焼き付けることにより固定した。このフィルターをヒートシールバッグに入れ、アレハイ

に 4-カルボキシベンズアルデヒド 3.75 g、ベンズアルデヒド 7.96 g を加え 120℃ で加熱しながら、ピロール 6.71 g を 10 分かけて滴下した。滴下後、2 時間 120℃ で攪拌した後、室温にて放冷し減圧濃縮した。得られた固体はシリカゲルカラムクロマトグラフ (展開溶媒: 2% メタノール + 1% 酢酸 / クロロホルム) により精製した。この  $\alpha$ -(4-カルボキシフェニル)- $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -トリフェニルボルフィン 200 mg を 800 ml の酢酸に溶解し、塩化第二鉄 6 水和物 90 mg および塩化水銀 5 mg を加え 120℃ で 16 時間加熱攪拌した。放冷後生じた結晶をろ取し酢酸で洗浄し乾燥した。この  $\alpha$ -(4-カルボキシフェニル)- $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -トリフェニルボルフィナトFe(III) 150 mg、およびエチレンジアミン塩 2.13 g を THF : H<sub>2</sub>O = 1 : 1 の混合溶液 15 ml に溶解し WSC 3.10 g を加え室温で 24 時間攪拌した。反応混合物を濃縮し残渣を 0.1 N の NaOH 水溶液 20 ml に懸濁し、沈殿物を遠心により分離した。得ら

ブリダイゼーション緩衝液 2 ml を加え、42℃ の水浴中で 2 時間、ついでこの緩衝液に作成した DNA アプローブ 10 μl を加え、16 時間インキュベートした。つぎに、 $1.7 \times 10^{-5}$  M ルミノール、10 mM KOH、5 mM ほう酸、及び、過酸化水素 0.005% を含む溶液にハイブリダイゼーションしたニトロセルロースフィルターを浸し、直ちにプラスチック薄膜 (たとえばサラップなど) を介して、生じた化学発光をインスタントフィルムに写しとった。インスタントフィルムはボラロイド社の 612 フィルム (ISO 20,000) を使い、露光時間は 10 分間とした。現像した結果、スポットした DNA 量は 10 pg でも検出可能であった。

1-3. 化合物 1 で標識した DNA の化学発光法による検出 (2)

実施例 1-2 においてハイブリダイゼーション後のニトロセルロースフィルターを各スポット毎に切断し、それぞれのフィルターを発光液 (組成は実施例 1-2 と同様) に浸し、1 分後にその化

化学発光をフロンカウンタ（浜松ホトニクス社製）を用いて10分間計測した。その結果、10 pgのDNAを検出できた。

#### 実施例2

2-1.  $\alpha$ -(4-イソチオシアナトエチルカルバモイルフェニル)- $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -トリフェニルポルフィナトFe(II) 2の合成

二酸化炭素100mg、トリエチルアミン1mlを混合し、これに実施例1で合成した、 $\alpha$ -(4-アミノエチルカルバモイルフェニル)- $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -トリフェニルポルフィナトFe(II)の結晶100mgを1mlのTHFに溶解し、0℃で加えた。30分攪拌後、生じた沈殿を濾過し乾燥した。これをクロロホルム8mlに溶かしトリエチルアミン1mlを加え0℃でクロロ酢酸エチル0.1mlを加え1時間反応させた。クロロホルム相を3M塩酸で洗浄し、クロロホルムを留去して得られた結晶をシリカゲルカラムクロマトグラフ（展開溶媒：酢酸エチル）により精製し、化合物2を得た。

#### 実施例3

3-1.  $\alpha$ -(4-アミノエチルカルバモイルフェニル)- $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -トリフェニルポルフィナトCo(II) 3の合成

実施例1と同様の操作で合成した。但し、金属塩として塩化コバルト(II)を用いた。

3-2. 化合物3で標識したDNAの化学発光法による検出

実施例1と同様の操作によりスファージDNAを用い化合物3で標識した。また、検出法もルミノールを用い実施例1と同様に行い、標識DNAを用いてスファージDNA量10pgを検出できた。

#### 実施例4

4-1.  $\alpha$ -(4-イソチオシアナトエチルカルバモイルフェニル)- $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -トリフェニルポルフィナトCu(II) 4の合成

実施例2と同様の操作で合成した。但し、金属塩として塩化銅(II)を用いた。

4-2. 化合物4で標識したタンパク質の化学発

光による検出

ヒト血清アルブミン(HSA)5.0mgを含むpH7.2のりん酸緩衝液1mlに1mgの化合物2をDMSO100 $\mu$ lに溶かして加え、室温で1時間振とうしHSAを標識した。これはセファデックスG50により精製し凍結乾燥し、pH7.2のりん酸緩衝液1mlに溶解した。96穴マイクロタイタープレートにそれぞれ、1pg、10pg、100pg、1ng、10ng、および100ngの標識HSAが含まれるように上記溶液を入れ、全量が100 $\mu$ lになるようにpH7.2のりん酸緩衝液をそれぞれ加えた。つぎに、 $3.4 \times 10^{-5}$ Mルミノール、20mMKOH、10mMほう酸、0.01%過酸化水素を含む溶液100 $\mu$ lを加え、生じた化学発光をインスタントフィルムに写しとった。インスタントフィルムはボラロイド社の612フィルムを用い、露光時間は10分間とした。現像した結果、標識HSA量1pgを検出できた。

光法による検出

実施例2と同様の操作によりHSAを用い化合物4で標識した。また、検出法もルミノールを用い実施例2と同様に行い、標識HSA量100pgまでを検出できた。

#### 実施例5

5-1.  $\alpha$ -(4-(N-サクシンイミドキシホルミルエチル)ピリジル)- $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -トリス(4-ピリジル)ポルフィナトFe(II) 5の合成

無水酢酸11.3g、アロピオン酸200mlに4-ピリジンカルボキシアリド10.7gを加え120℃で加熱しながら、6.71gのピロールを10分かけて滴下した。滴下後、2時間120℃で攪拌した後、室温にて放冷し生じた沈殿を濾取し、メタノールおよび水で洗浄し乾燥した。この $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -テトラキス(4-ピリジル)ポルフィン1.0gをピリジン100mlに溶解し、塩化第二鉄6水和物480mgを加え120℃で16時間加熱攪拌した。放冷後、減圧

過剰した。得られた $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ -テトラキス(4-ヒリジル)ポルフィナトFe(Ⅱ) 1.0gと3-プロモプロピオン酸エチル380mgをDMF10ml中80℃で3時間反応させ、生じた混合物をシリカゲルカラムクロマトグラフ(展開溶媒:2%メタノール/クロロホルム)により精製した。得られた結晶100mgをエタノール30mlに溶解し1Mの水酸化カリウム水溶液を0.12ml加え、室温で24時間攪拌した。過剰後、酒石酸水溶液ついで水で洗浄し乾燥した。得られた固体をDMF5mlに溶かし、N-ヒドロキシサクシンイミド25mg、DCC50mgを加えて室温で24時間攪拌した。過剰後、酢酸エチルを加え不溶物を濾過し、濾液を濃縮しベンゼンを加え生じた結晶を採取し乾燥して化合物5を得た。

5-2. 化合物5で標識したタンパク質の化学発光法による検出

実施例2と同様の操作によりHSAを用い化合物5で標識した。また、検出法もルミノールを用

溶解しヒドラジン1水和物1mlとパラジウム炭素20mgを加えて2時間還流した。反応物を濾過し濾液を濃縮し、得られた固体を水洗して乾燥し、化合物5を得た。

6-2. 化合物5で標識したDNAの化学発光法による検出

実施例1と同様の操作により $\lambda$ ファージDNAを用い化合物5で標識した。また、検出法もルミノールを用い実施例1と同様に行い、標識DNAを用いて $\lambda$ ファージDNA量10pgを検出できた。

#### 四置換ポルフィリン錯体の一般的合成法

置換基R(Rは一般構造式中のXの形成に必要な任意の官能基)を有するベンズアルデヒド、チオフェンカルボキシアルデヒド、フラアルデヒド、あるいはヒリジルアルデヒドを有機酸性溶媒中で加熱しながら、等モルのピロールを滴下する。有機酸性溶媒としてはプロピオン酸が一般に適當である。滴下後、数時間加熱し、放冷後生じた沈殿物を採取し、酢酸、水、あるいは有機溶媒で洗浄

し乾燥する。

#### 実施例6

6-1.  $\alpha$ -(3-アミノ(2-チエニル))- $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ -トリス(2-チエニル)ポルフィナトFe(Ⅱ)5の合成

無水酢酸11.3g、プロピオン酸200mlに2-ニトロ-5-チオフェンカルボキシアルデヒド3.92gおよび2-チオフェンカルボキシアルデヒド8.41gを加え120℃で加熱しながら、ピロール6.71gを10分かけて滴下した。滴下後、2時間120℃で攪拌した後、室温にて放冷し生じた沈殿を採取し酢酸およびメタノールで洗浄し乾燥した。得られた混合物は実施例1と同様にシリカゲルカラムクロマトグラフにより精製した。ついで、実施例1と同様の操作で塩化第二鉄6水和物を用い、ポルフィナトFe(Ⅱ)錯体とした。得られた $\alpha$ -(3-ニトロ(2-チエニル))- $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ -トリス(2-チエニル)ポルフィナトFe(Ⅱ)50mgをメタノールに

し乾燥する。

得られた四置換ポルフィリンを等モルの任意の金属塩あるいは金属アセチルアセトナト錯体等の金属化合物と共に有機溶媒中で反応させる。有機溶媒としては酢酸、ベンゼン、ヒリジン等が一般に適當である。反応後、溶媒を留去するが、あるいは生成した沈殿を採取し水または有機溶媒による洗浄により精製する。

分子内の置換基Rは、そのままもしくは任意の官能基に変換した後、一般構造式中のYとして用いるか、あるいは、そのままもしくは任意の官能基に変換後、一般構造式中のX-Lの形成に必要な試薬と共に溶媒中で反応し、洗浄あるいはカラムクロマトグラフで精製する。側鎖を導入した場合、その末端官能基は、そのままもしくは任意の官能基に変換して一般構造式中のYとする。

一般構造式中のX-L-Yについてはそのうちの数種について実施例の項で詳細を記す。

以下に合成した新規ポルフィリン錯体化合物の一部を示す。

$\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -テトラキス(4-アミノエチルカルバモイルフェニル)ボルフィナトDc (Ⅲ) 青紫色結晶

$\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -テトラキス(4-アミノエチルカルバモイルフェニル)ボルフィナトCr (Ⅳ) 紫色結晶

$\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -テトラキス(4-アミノエチルカルバモイルフェニル)ボルフィナトMo (V) 青紫色結晶

$\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -テトラキス(4-ホルミルプロピルアミドエチルカルバモイルフェニル)ボルフィナトDc (Ⅲ) 青紫色結晶

$\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -テトラキス(4-ホルミルプロピルアミドエチルカルバモイルフェニル)ボルフィナトCr (Ⅳ) 青紫色結晶

$\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -テトラキス(4-イソシアナトプロピルカルバモイルフェニル)ボルフィナトDc (Ⅲ) 青紫色結晶

$\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -テトラキス(4-イソシアナトプロピルカルバモイルフェニル)ボルフィナト

ンイミドキシホルミルエチル)ピリジル)ボルフィナトZn (Ⅵ) 青紫色結晶

$\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -テトラキス(3-アミノエチルカルバモイル(2-チエニル))ボルフィナトFe (Ⅶ) 黒紫色結晶

$\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -テトラキス(3-アミノエチルカルバモイル(2-フリル))ボルフィナトFe (Ⅶ) 青紫色結晶

$\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -テトラキス(4-(カルボキシブチルチオ)フェニル)ボルフィナトNi (Ⅷ) 紫色結晶

$\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -テトラキス(4-(カルボキシエチルアミド)フェニル)ボルフィナトCu (Ⅸ) 青紫色結晶

$\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -テトラキス(4-(イソシアナトエチル)-2,6-ジクロロフェニル)ボルフィナトFe (Ⅲ) 青紫色結晶

$\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -テトラキス(4-(アミノエトキシカルボニル)フェニル)ボルフィナトMn (Ⅹ) 紫色結晶

Co (Ⅱ) 黒紫色結晶

$\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -テトラキス(4-イソシアナトプロピルカルバモイルフェニル)ボルフィナトZn (Ⅵ) 紫色結晶

$\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -テトラキス(4-サクシンイミドキシホルミルエチルアミドフェニル)ボルフィナトDc (Ⅲ) 黒紫色結晶

$\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -テトラキス(4-サクシンイミドキシホルミルエチルアミドフェニル)ボルフィナトDc (Ⅲ) 黒紫色結晶

$\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -テトラキス(4-サクシンイミドキシホルミルエチルアミドフェニル)ボルフィナトOs (Ⅺ) 青紫色結晶

$\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -テトラキス(4-(N-サクシンイミドキシホルミルエチル)ピリジル)ボルフィナトFe (Ⅲ) 青紫色結晶

$\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -テトラキス(4-(N-サクシンイミドキシホルミルエチル)ピリジル)ボルフィナトMo (V) 紫色結晶

$\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -テトラキス(4-(N-サクシ

#### 実施例7

7-1.  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -テトラキス(4-アミノエチルカルバモイルフェニル)ボルフィナトFe (Ⅲ) Ⅱの合成

4-カルボキシベンズアルデヒドとピロールを等モル用い、実施例1と同様の操作で合成した。精製は熱酢酸による洗浄で行った。

7-2. 化合物Ⅱで標識したDNAの化学発光による検出

実施例1と同様の操作により入ファージDNAを用い化合物Ⅱで標識した。また、検出法もルミノールを用い実施例1と同様に行い、標識DNAを用いて入ファージDNA量10pgを検出できた。

#### 実施例8

8-1.  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -テトラキス(4-サクシンイミドキシホルミルエチルアミドフェニル)ボルフィナトFe (Ⅲ)の合成

無水酢酸11.3g、アロピオン酸200mlにp-ニトロベンズアルデヒド15.1gを加え



120℃で加熱しながら、アルコール6.71gを10分かけて滴下した。2時間120℃を保った後、室温にて放冷し生じた結晶を採取し、酢酸およびTHFで洗浄し乾燥した。この結晶1.0gをメタノール100mlに溶解し、ヒドラジン1水和物10mlとパラジウム炭素100mgを加え、2時間回流後濾過し母液を濃縮し、生じた固体を水洗し乾燥して $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ -テトラキス(4-アミノフェニル)ポルフィリンとした。この固体820mgを1.5lの酢酸に懸濁し、塩化第二鉄6水和物360mgおよび塩化水銀10mgを加え110℃で16時間加熱攪拌した。放冷後、生じた結晶を採取し酢酸で洗浄し乾燥した。このポルフィリン鉄錯体を50mg用いてTHF5mlに溶解し、無水コハク酸523mgを加え室温で24時間攪拌した。濃縮後、クロロホルム5mlを加え沈殿を採取し0.1Nの塩酸および水で洗浄し乾燥した。この固体をDMF5mlに溶かし、N-ヒドロキシコハク酸イミド36mg、DCC65mgを加え0℃で2時間、のち室温に

た。

#### 実施例10

10-1.  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ -テトラキス(4-サクシンイミドキシホルミルエチルアミドフェニル)ポルフィナトCr(III)10の合成

実施例8と同様の操作で合成した。但し、金属塩として塩化クロム6水和物を用いた。

10-2. 化合物10で標識したタンパク質の化学発光法による検出

実施例2と同様の操作によりHSAを用い化合物10で標識した。また、検出法もルミノールを用い実施例2と同様に行い、標識HSA量10pgまでを検出できた。

#### 実施例11

11-1.  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ -テトラキス(4-N-サクシンイミドキシホルミルエチルピリジル)ポルフィナトFe(III)の合成

実施例5により得られた $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ -テトラキス(4-ピリジル)ポルフィナトFe(III)500mgと3-ブロモプロピオン酸エチル76

24時間攪拌し、濃縮後、酢酸エチルに溶解し不溶物を除き、再度濃縮して化合物12を得た。  
8-2. 化合物12で標識したタンパク質の化学発光法による検出

実施例2と同様の操作によりHSAを用い化合物12で標識した。また、検出法もルミノールを用い実施例2と同様に行い、標識HSA量1pgを検出できた。

#### 実施例9

9-1.  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ -テトラキス(4-アミノエチルカルバモイルフェニル)ポルフィナトCo(II)9の合成

実施例7と同様の操作で合成した。但し、金属塩として塩化コバルト6水和物を用いた。

9-2. 化合物9で標識したDNAの化学発光法による検出

実施例1と同様の操作により入ファージDNAを用い化合物9で標識した。また、検出法もルミノールを用い実施例1と同様に行い、標識DNAを用いて入ファージDNA量10pgを検出でき

0mgをDMF10ml中室温で24時間反応させ、エーテル100mlを加え生じた沈殿を採取した。得られた固体100mgをエタノール30mlに溶解し1M水酸化カリウム水溶液0.40mlを加え、室温で24時間攪拌した。濃縮後、活性炭水溶液ついで水で洗浄し乾燥した。得られた固体をDMF5mlに溶かし、N-ヒドロキシサクシンイミド20mg、DCC40mgを加えて室温で24時間攪拌した。濃縮後酢酸エチルを加え不溶物を濾過し、母液を濃縮しベンゼンを加え生じた結晶を採取し乾燥して化合物11を得た。  
11-2. 化合物11で標識したタンパク質の化学発光法による検出

実施例2と同様の操作によりHSAを用い化合物11で標識した。また、検出法もルミノールを用い実施例2と同様に行い、標識HSA量1pgでも検出できた。

#### 実施例12

12-1.  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ -テトラキス(3-アミノエチルスルファモイル(2-フリル))ポル

フィナトFe(Ⅱ)の合成

無水酢酸11.3g、プロピオン酸200mlに2-フラアルデヒド9.61gを加え120℃で加熱しながら、ピロール6.71gを10分かけて滴下した。滴下後、2時間120℃で攪拌した後、室温にて放冷し生じた沈殿を採取し、酢酸で洗浄し乾燥した。この固体750mgを1.5lの酢酸に懸濁し、塩化第一鉄4水和物290mgを加え120℃で4時間加熱攪拌した。放冷後、生じた結晶を採取し酢酸で洗浄し乾燥した。この $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ -テトラキス(2-フリル)ボルフィナトFe(Ⅱ)500mgを0℃でクロロホルボン酸5mlに少しずつ加え、2時間攪拌した。これを100mlの水に注ぎ、沈殿を採取し水洗し乾燥した。得られた結晶100mgを乾燥したTHF20mlに溶解し、エチレンジアミン500mgを加え1時間室温で攪拌した。反応混合物を水100mlに注ぎ、生じた沈殿を採取し水洗し乾燥して、化合物12を得た。

12-2. 化合物12で置換したDNAの化学発

ア水中加熱してフタルアミド誘導体とする。これをピリジンに溶かしオキシ塩化りんを滴下して析出物を水洗しフタルニトリル誘導体とする。つぎに、ナトリウムイソアミルアルコキシドとモリブデン酸アンモニウムと共に、イソアミルアルコール中120℃で加熱攪拌後メタノールを加え、生じる沈殿を採取し、洗浄あるいはシリカゲルカラムクロマトグラフで精製して、置換フタロシアニン誘導体を合成する。得られたフタロシアニン誘導体を等モルの任意の金属塩あるいは金属アセチルアセトナト錯体の金属化合物と共に有機溶媒中で反応させる。有機溶媒としては酢酸、ベンゼン、ピリジン等が一般に適當である。反応後生成した沈殿を採取し酢酸、ベンゼン、ピリジン等から洗浄あるいは再結晶し置換フタロシアニン錯体を合成する。

分子内置換基Rはそのまま、もしくは任意の官能基に交換した後、一般構造式中のYとして用いるか、あるいは、そのまま、もしくは任意の官能基に交換後、一般構造式中のX-Lの形成に必要

光法による検出

実施例1と同様の操作により入ファージDNAを用い化合物12で置換した。また、検出法もルミノールを用い実施例1と同様に行い、置換DNAを用い入ファージDNA量10pgを検出できた。

#### 四置換フタロシアニン錯体の一般合成法

置換基R(Rは一般構造式中のXの形成に必要な任意の官能基)を有するキシレンをピリジン-水混合溶媒中で加熱後、過マンガン酸カリウムを少しずつ加えて酸化しフタル酸誘導体とする。が液を濃縮し、塩酸を加えて析出する結晶を水洗し、乾燥後有機溶媒に溶解する。有機溶媒としてはクロロホルムが一般に適當である。伊過により不溶物を除き伊液を濃縮して固体を得る。つぎにこのフタル酸誘導体を無水酢酸中で加熱回流し濃縮後、石油エーテルで洗浄し、クロロホルムに溶解、伊過して不溶物を除き濃縮して酸無水物とする。この酸無水物を尿素と175℃で加熱後、冷却して水洗しフタルイミド誘導体とし、さらにアンモニ

な試薬とともに溶媒中で反応し、洗浄あるいはシリカゲルカラムクロマトグラフで精製する。錯体を導入した場合、その末端官能基は、そのまま、もしくは任意の官能基に交換して一般構造式中のYとする。一般構造式中のX-L-Yについては、そのうちの数種について実施例の項で詳細を記す。

以下に合成した新規四置換フタロシアニン錯体化合物の一部を示す。

3, 10, 17, 24-テトラキス(アミノエチルカルバモイル)フタロシアナトFe(Ⅱ)黒青色結晶

3, 10, 17, 24-テトラキス(アミノエチルカルバモイル)フタロシアナトCo(Ⅱ)黒青色結晶

3, 10, 17, 24-テトラキス(アミノエチルカルバモイル)フタロシアナトCr(Ⅲ)黒青色結晶

3, 10, 17, 24-テトラキス(アミノエチルカルバモイル)フタロシアナトNi(Ⅱ)黒青色結晶

3, 10, 17, 24-テトラキス(ホルミルプロピルアミドエチルカルバモイル)フタロシアナトFe(Ⅱ) 紫色結晶

3, 10, 17, 24-テトラキス(ホルミルプロピルアミドエチルカルバモイル)フタロシアナトCr(Ⅲ) 紫色結晶

3, 10, 17, 24-テトラキス(ホルミルプロピルアミドエチルカルバモイル)フタロシアナトCo(Ⅱ) 青紫色結晶

3, 10, 17, 24-テトラキス(サクシニミドキシホルミルエチルアミド)フタロシアナトMo(Ⅴ) 黒青色結晶

3, 10, 17, 24-テトラキス(サクシニミドキシホルミルエチルアミド)フタロシアナトZn(Ⅱ) 青色結晶

3, 10, 17, 24-テトラキス(サクシニミドキシホルミルエチルアミド)フタロシアナトOs(Ⅱ) 青紫色結晶

3, 10, 17, 24-テトラキス(サクシニミドキシホルミルエチルアミド)フタロシアナト

Aを用いて入ファージDNA量100pgを検出できた。

#### 実施例14

14-1. 3, 10, 17, 24-テトラキス(サクシニミドキシホルミルエチルアミド)フタロシアナトFe(Ⅱ)の合成

4-ニトロ- $\alpha$ -キシレンを用い、一般合成法に従って合成し、塩化第一スズおよび塩酸により還元し3, 10, 17, 24-テトラキスアミノフタロシアニンとした。この化合物400mgを50mlのピリジンに溶かし、1.25gの無水コハク酸を加え室温で16時間攪拌した。反応混合物を濃縮し、0.1Nの塩酸水溶液20mlに懸濁し遠心分離にて固体を取り乾燥して、3, 10, 17, 24-テトラキス(カルボキシエチルアミド)フタロシアニンとした。これを一般合成法に従ってFe(Ⅱ)錯体としたのち、200mgをDMFに溶かし、N-ヒドロキシコハク酸イミド100mg、DCC160mgを0℃で加え2時間攪拌後、室温にもどして16時間反応させ

Mo(Ⅴ) 黒青色

#### 実施例13

13-1. 3, 10, 17, 24-テトラキス(アミノエチルカルバモイル)フタロシアナトFe(Ⅱ) 13の合成

4-カルボキシ- $\alpha$ -キシレン(3, 4-ジメチル安息香酸)を用い、一般合成法に従って合成した。3, 10, 17, 24-テトラカルボキシフタロシアナトFe(Ⅱ) 120mgとエチレンジアミン塩酸塩2.13gをTHF:H<sub>2</sub>O=1:1の混合溶液に溶解しWSC3, 10gを加え室温で24時間攪拌した。反応混合物を濃縮し残渣を0.1NのNaOH水溶液20mlに懸濁し、沈殿物を遠沈により分離した。得られた固体を乾燥し、化合物13を得た。

13-2. 化合物13で標識したDNAの化学発光法による検出

実施例1と同様の操作により入ファージDNAを用い化合物13で標識した。また、検出法もルミノールを用い実施例1と同様に行い、標識DNA

を用い化合物13で標識した。また、検出法もルミノールを用い実施例1と同様に行い、標識DNA

を用い化合物13で標識した。また、検出法もルミノールを用い実施例1と同様に行い、標識DNA

を用い化合物13で標識した。また、検出法もルミノールを用い実施例1と同様に行い、標識DNA

#### 実施例15

15-1. 3, 10, 17, 24-テトラキス(アミノエチルカルバモイル)フタロシアナトCo(Ⅱ) 15の合成

実施例13と同様の操作で合成した。但し、金属塩として塩化コバルト(Ⅱ)を用いた。

15-2. 化合物15で標識したDNAの化学発光法による検出

実施例1と同様の操作により入ファージDNAを用い化合物15で標識した。また、検出法もルミノールを用いて実施例1と同様に行い、標識DNAを用いて入ファージDNA量100pgを検

出できた。

#### 実施例 16

16-1. 3, 10, 17, 24-テトラキス  
(サクシンイミドキシホルミルエチルアミド) フ  
タロシアナトMo (Ⅱ) 16の合成

実施例 14と同様の操作で合成した。但し、金  
属塩として塩化モリブデンを用いた。

16-2. 化合物 16で標識したタンパク質の化  
学発光による検出

実施例 2と同様の操作によりHSAを用い化合  
物 16で標識した。また、検出法もルミノールを  
用い実施例 2と同様に行い、標識HSA量100  
pgまでを検出できた。

#### 一置換フタロシアニン誘導体の一般的合成法

四置換フタロシアニン誘導体の一般的合成法に  
準じて置換基Rを有するフタロニトリル誘導体、  
および、キシレンを出発物質として得られるフタ  
ロニトリルを合成する。これらを1:3のモル比  
で加え、3-置換フタロシアニン誘導体を合成す  
る。精製は一般にシリカゲルカラムクロマトグラ

3-ホルミルプロピルアミドエチルカルバモイル  
フタロシアナトCr (Ⅲ) 紫色結晶

3-ホルミルプロピルアミドエチルカルバモイル  
フタロシアナトMn (Ⅱ) 黒青色結晶

3-イソシアナトエチルカルバモイルフタロシア  
ナトFe (Ⅲ) 黒青色結晶

3-イソシアナトエチルカルバモイルフタロシア  
ナトMo (Ⅴ) 黒紫色結晶

3-イソシアナトエチルカルバモイルフタロシア  
ナトCr (Ⅲ) 青色結晶

3-イソシアナトエチルカルバモイルフタロシア  
ナトCu (Ⅱ) 黒青色結晶

3-イソシアナトエチルカルバモイルフタロシア  
ナトOs (Ⅲ) 黒青色結晶

#### 実施例 17

17-1. 3-アミノエチルカルバモイルフタロ  
シアナトFe (Ⅲ) 17の合成

一般合成法に従って合成した。3-カルボキシ  
フタロシアナトFe (Ⅲ)を用い、実施例 13と  
同様の操作により化合物 17を合成した。

フにより行う。Rをそのまま、あるいはRを任  
意の官能基に変換した後、一般構造式中のYとし  
て用いるか、あるいは、そのまま、もしくは任意  
の官能基に変換後、一般構造式中のX-Lの形成  
に必要な試薬とともに溶液中で反応しカラムクロ  
マトグラフにより精製する。

一般構造式中のX-L-Yについては、そのう  
ちの致種について実施例の項で詳細を記す。

以下に合成した新規フタロシアニン錯体化合物  
の一部を示す。

3-アミノエチルカルバモイルフタロシアナト  
Fe (Ⅲ) 黒青色結晶

3-アミノエチルカルバモイルフタロシアナト  
Co (Ⅱ) 黒青色結晶

3-アミノエチルカルバモイルフタロシアナト  
Ni (Ⅱ) 黒青色結晶

3-アミノエチルカルバモイルフタロシアナト  
Mn (Ⅱ) 黒青色結晶

3-ホルミルプロピルアミドエチルカルバモイル  
フタロシアナトFe (Ⅲ) 紫色結晶

17-2. 化合物 17で標識したDNAの化学発  
光法による検出

実施例 1と同様の操作によりλファージDNA  
を用い化合物 17で標識した。また、検出法もル  
ミノールを用い実施例 1と同様に行い、標識DN  
Aを用いてλファージDNA量10pgを検出で  
きた。

#### 実施例 18

18-1. 3-イソシアナトエチルカルバモイル  
フタロシアナトFe (Ⅲ) 18の合成

一般合成法に従って合成した3-カルボキシフ  
タロシアナトFe (Ⅲ)とエチレンジアミンをW  
SCで反応させることにより、実施例 13と同様  
にして3-アミノエチルカルバモイルフタロシア  
ナトFe (Ⅲ)を合成した。二硫化炭素0.54  
g、トリエチルアミン1mlを混合して0℃で3  
-アミノエチルカルバモイルフタロシアナトFe  
(Ⅲ)を加えた。その後1時間攪拌して生じた沈  
殿をろ取し乾燥した後、クロロホルムに溶かしト  
リエチルアミン1mlを加えて0℃でクロロギ酸

エチル 1 ml を加えた。1 反応後、3 M 塩酸で洗浄してクロロホルムを留去し、生じた固体をシリカゲルカラムクロマトグラフにより精製し、化合物 18 を得た。

18-2. 化合物 18 で標識したタンパク質の化学発光法による検出

実施例 2 と同様の操作により HSA を用い化合物 18 で標識した。また、検出法もルミノールを用い実施例 2 と同様にを行い、標識 HSA 量 100 pg を検出できた。

#### 実施例 19

19-1. 3-アミノエチルカルバモイルフタロシアナト Cu (II) 19 の合成

実施例 13 と同様の操作により合成した。但し、金属塩として第二塩化銅を用いた。

19-2. 化合物 19 で標識した DNA の化学発光法による検出

実施例 1 と同様の操作によりスファージ DNA を用い化合物 19 で標識した。また、検出法もルミノールを用い実施例 1 と同様にを行い、標識 DN

A を用いてスファージ DNA 量を 100 pg まで検出できた。

#### 実施例 20

20-1. 3-イソチオシアナトエチルカルバモイルフタロシアナト Co (II) 21 の合成

実施例 18 と同様の操作により合成した。但し、金属塩として塩化コバルトを用いた。

20-2. 化合物 20 で標識したタンパク質の化学発光法による検出

実施例 2 と同様の操作により HSA を用い化合物 20 で標識した。また、検出法もルミノールを用いて実施例 2 と同様にを行い、標識 HSA 量 100 pg を検出できた。

以上

Generate Collection

## Search Results - Record(s) 1 through 1 of 1 returned.

☐ 1. Document ID: JP 03038587 A

L1: Entry 1 of 1

File: DWPI

Feb 19, 1991

DERWENT-ACC-NO: 1991-092279

DERWENT-WEEK: 199113

COPYRIGHT 2000 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Stable labelled cpd. for catalysing oxidn. - is metal complex cpd. with porphyrin nucleus, used to determine trace amts. of nucleic acid or protein

PRIORITY-DATA:

1989JP-0171372

July 3, 1989

PATENT-FAMILY:

PUB-NO

PUB-DATE

LANGUAGE

PAGES

MAIN-IPC

JP 03038587 A

February 19, 1991

N/A

000

N/A

INT-CL (IPC): B01J 31/22; C07D 487/22

ABSTRACTED-PUB-NO: JP03038587A

BASIC-ABSTRACT:

Metal complex cpd. is of formula Z-(X-L-Y)<sub>n</sub> (n is 0-4 integer) where Z is metal complex of formula (I) contg. porphyrin nucleus. In (I): A-D are SP<sup>2</sup> carbon or nitrogen, R<sub>1</sub>-R<sub>8</sub> are -(CH)<sub>k</sub>-E or -(CH=CH)<sub>k</sub>-E (k is 0 or 1, R is H or OH, E is H, CHO, CO<sub>2</sub>H, or SO<sub>3</sub>H, and R, E may combine with X); and R<sub>1</sub>-R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>-R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>-R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>-R<sub>8</sub> may be a benzene ring condensed to a pyrrole ring. Meso portion substituent groups RA-RD of formula (II), (III) or (IV), where T<sub>1</sub>-R<sub>5</sub> is H, halogen, or alkyl gp. and one of them may combine with X; G is O or S, T<sub>6</sub>-T<sub>8</sub> is H, halogen or alkyl gp. and one of them may combine with X; and T<sub>9</sub>-T<sub>13</sub> is H, halogen or alkyl gp. and one of them may combine with X; and Q is halide anion, CH<sub>3</sub>SO<sub>4</sub>-OSO<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>-OSO<sub>2</sub>F- or OSO<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>. Metal M is Fe, CR, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, Mo, Cd, or Os. X is a junction part of porphyrin nucleus and spacer L, and is -NHCO-, -CONH-, -NHSO<sub>2</sub>-, -SO<sub>2</sub>NH-, -COO-, etc. L is spacer which combines a functional gp. Y and X, and -(CH)<sub>m</sub>-, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>m</sub>- or -(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-, where R is H or OH, and m is 0-10 integer. Y is a functional gp. which covalently combines with a protein or a nucleic acid, or such a group as can be converted into the functional gp. USE/ADVANTAGE - Trace amts. of nucleic acid or protein can be determined by chemical luminescence. This cpd. is easily labelled, has small mol. wt. and is stable because no enzyme is used.

Full	Title	CIT.1	REV.1	CLS.1	REF.1	DRAW.1
------	-------	-------	-------	-------	-------	--------

Generate Collection

Term	Documents
JP-03038587-\$	0
JP-03038587-A.DWPI.	1
JP-03038587-\$.DID..DWPI.	1

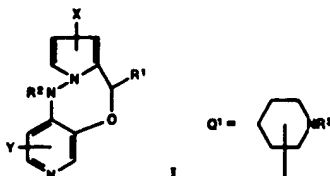
Display

100 Documents, starting with Document: 1

in MeCOH and the mixture allowed to react at room temp. for 2 h to give 56% I ( $R^1 = Ph, R^2 = Me, R^3 = Me, R^4 = Ph, X = O$ ). A total of 170 I were prepd. and 10 I at 10 g/10 are by preemergent application completely controlled 5 weeds, e.g. *Echinochloa crus-galli* and *Monochoria vaginalis* and gave no damage to rice seedlings.

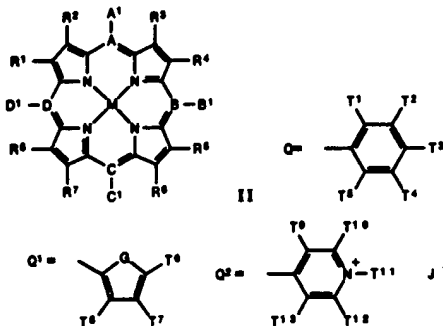
### SEVEN- AND HIGHER-MEMBERED RINGS

115: 92308a Preparation of pyrido [3,4-b]pyrrolo[1,2-e][1,4,5]-oxadiazepines as analgesics. Effland, Richard C.; Davis, Larry (Hoechst-Roussel Pharmaceuticals, Inc.) U.S. 5,015,637 (Cl. 514-211; C07D273/06), 14 May 1991, Appl. 529,082, 25 May 1991, 5 pp. Title compds. I;  $X = H, \text{halo, alkyl}; Y = X, \text{alkoxy, CF}_3; R^1 =$



H, alkyl, aryl, arylalkyl, dialkylaminoalkyl,  $Q^1$ ;  $R^2, R^3 = H, \text{alkyl, aralkyl}$ , were prepd. Thus, 4-chloro-3-fluoropyridine and *N*-(*me*-thylamino)pyrrole were refluxed 4 h in MeCHOH contg. ethereal HCl to give *N*-(3-fluoro-4-pyridinyl)-*N*-methyl-1*H*-pyrrol-1-amine. The latter was formylated with POCl<sub>3</sub>/Me<sub>2</sub>NCHO followed by redn. with NaBH<sub>4</sub> to give 1-(3-fluoro-4-pyridinylmethylamino)-1*H*-pyrrole-2-methanol. The latter was heated 2 h with NaH in DMF to give I ( $R^1 = X = Y = H, R^2 = Me$ ) (II). II at 20 mg/kg s.c. in mice gave 58% inhibition of phenylquinone-induced writhing in mice.

115: 92309b Preparation of metal-porphyrin complexes catalyzing oxidation reaction as labeling agents for trace detection of DNA and proteins. Ueno, Keihei; Sagara, Fumio; Shiga, Tadanobu (Dojindo Laboratories) Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 03 38,587 [91 38,587] (Cl. C07D487/22), 19 Feb 1991, Appl. 89/171,372, 03 Jul 1989; 13 pp. The title compds. Z-(X-L-Y)<sub>n</sub> I; Z



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**